中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因的克隆及不同发育阶段表达分析

曾 晶[#], 潘其忠[#], 王子龙, 吴小波, 颜伟玉, 曾志将[*]
(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 为探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana dynactin p*62 基因的表达特性, 本研究克隆了中华蜜蜂 *dynactin p*62 的基因组 DNA 序列(GenBank 登录号: JX101463) 和 mRNA 序列(GenBank 登录号: JX101464); 采用荧光定量 PCR 检测了中华蜜蜂 *dynactin p*62 在不同发育时期(3 日龄和 6 日龄幼虫、刚羽化出房蜜蜂)三型蜂中 mRNA 的表达量。结果表明: 该基因基因组 DNA 序列全长为 2 403 bp, mRNA 序列全长为 1 491 bp, 编码 496 个氨基酸残基, 预测的蛋白分子量为 56.49 kD, 等电点为 8.31。系统发育分析表明中华蜜蜂 *dynactin p*62 与西方蜜蜂 *Apis mellifera dynactin p*62 聚成一支。该基因在不同发育时期均有表达, 在雌性蜜蜂(蜂王和工蜂)中, 刚羽化成虫期的表达量显著高于幼虫期($P<0.05$), 并且同一发育时期相比, 工蜂的表达量显著高于蜂王($P<0.05$); 而该基因在雄蜂中表达量没有明显的规律性。这些结果提示该基因可能与中华蜜蜂级型分化有关。

关键词: 中华蜜蜂; *dynactin p*62; 基因克隆; 序列分析; 差异表达
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)10-1132-10

Cloning and developmental expression of *dynactin p*62 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

ZENG Jing[#], PAN Qi-Zhong[#], WANG Zi-Long, WU Xiao-Bo, YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang[*]
(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To explore the expression characteristics of *dynactin p*62 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, the genomic DNA sequence (GenBank accession no. JX101463) and mRNA sequence (GenBank accession no. JX101464) of *dynactin p*62 in *A. cerana cerana* were cloned, and a quantitative analysis of its expression level at different developmental stages of the queen, worker and drone (3 and 6 d-old larvae, and newly eclosed bees) was conducted using real-time PCR. The full-length genomic DNA and mRNA sequences of *A. c. cerana dynactin p*62 are 2 403 bp and 1 491 bp, respectively, encoding 496 amino acids, and the predicted MW and pI are 56.49 kD and 8.31, respectively. Phylogenetic analysis indicated that *dynactin p*62 of both *A. c. cerana* and *A. mellifera* gathered in the same clade. The *A. c. cerana dynactin p*62 transcript was clearly detected at different developmental stages of the queens and workers, and it was expressed significantly higher in newly eclosed adults than in larvae ($P<0.05$); and its expression was higher in workers than in queens ($P<0.05$), but with no obvious regularity in drone. These results suggest that *dynactin p*62 may be involved in caste differentiation in *A. c. cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; *dynactin p*62; gene cloning; sequence analysis; differential expression

dynactin (dynein activator complex)是真核细胞中的多结构蛋白, 其主要功能是附着纤维蛋白和动力蛋白, 并将其转运至细胞器和泡囊。dynactin p62 是 dynactin 蛋白的 3 个组成部分之一, 位于末端, 生成的 *dynactin p*62 siRNA 能有效干扰外源基因的表达, 同时 dynactin p62 能识别并连接 ATP 水解酶, 并调节其活性。在人 *Homo sapiens* 细胞中 dynactin p62 的主要功能是维持 dynactin 蛋白结构

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20103603110003); 江西省自然科学基金项目(2010GZN0044)
作者简介: 曾晶, 女, 1988 年 11 月生, 江西萍乡人, 硕士研究生, E-mail: zeng.jing6668@163.com; 潘其忠, 男, 1989 年 12 月生, 江西赣州人, 硕士研究生, E-mail: panqizhong1989@163.com
[#]共同第一作者 Authors with equal contribution
[*]通讯作者 Corresponding author, Tel.: 0791-83828158; E-mail: bees1965@sina.com
收稿日期 Received: 2012-08-10; 接受日期 Accepted: 2012-10-16

和大脑皮层细胞结构（Karki *et al*., 2000）；在小鼠 *Mus musculus* 中 *dynactin p*62 与核转运基因 *Ropy*-2 高度同源，主要功能是连接蛋白质的氨基末端和维持细胞与蛋白质结构（Garces *et al*., 1999）；在果蝇 *Drosophila* 中 *dynactin p*62 的生物功能未知（Kucharski *et al*., 2008）。有研究表明，营养变化可导致果蝇中 *dynactin p*62 表达的差异（Kucharski *et al*., 2008）。

随着西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组测序的完成，西方蜜蜂 *dynactin p*62（The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006）也被预测出来。澳大利亚国立大学 Kucharski 等（2008）受果蝇实验启示，通过检测 *dynactin p*62 甲基化水平的差异来研究西方蜜蜂雌性蜜蜂级型分化，结果发现营养因素可通过影响 DNA 甲基化水平调控蜜蜂级型分化。Shi 等（2011）首次发现空间因素也可以通过影响 *dynactin p*62 的甲基化来调控西方蜜蜂雌蜂的发育。给西方蜜蜂雌蜂 3 d 幼虫头部注射 Dnmt3 siRNA，可以显著降低幼虫头部 *dynactin p*62 甲基化水平（Kucharski *et al*., 2008；石元元等，2011）。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国宝贵的蜂种资源，也是相对西方蜜蜂之外被大量家养的一个独立蜂种，两蜂种间存在生殖隔离。但引人关注的事实是，自中国引进西方蜜蜂 100 多年以来，中华蜜蜂分布区域和种群数量都明显减少，导致山林生物多样性降低（杨冠煌，2005）。

大量研究表明，西方蜜蜂 *dynactin p*62 甲基化与级型分化相关（Kucharski *et al*., 2008；Shi *et al*., 2011；石元元等，2011），但人们对中华蜜蜂 DNA 甲基化模式知之甚少。鉴于目前还没有关于中华蜜蜂 *dynactin p*62 的研究报道，为此我们对中华蜜蜂 *dynactin p*62 进行了克隆及差异表达分析，以期为研究中华蜜蜂级型分化的机理奠定理论基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　供试蜜蜂：取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂。

1.1.2　主要试剂与仪器：动物基因组 DNA 提取试剂盒（PUEX，北京）；胶回收试剂盒（PUEX，北京）；总 RNA 提取试剂盒 Trizol，pEasy-T3 载体，Trans-DH5α 感受态细胞，X-gal，IPTG，RNA 酶抑制剂购自全式金公司；DNA marker DL2000，M-MLV 反转录酶及 SYBR Green Ⅱ荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司；dNTPs，LA-Taq DNA polymerase 及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 PUEX 公司。DYY-4C 型电泳仪（北京六一科技有限公司产品），飞鸽 KA-1000 型普通离心机（上海安亭科学仪器厂公司产品），3H2ORI 型台式冷冻离心机（Eppendorf 5810R），移液枪（Eppendorf 公司产品），超净工作台（苏净集团安泰公司产品），533ZR659878 型 PCR 仪（Eppendorf Mastercycler Personal），564BR0381 型 Real-Time PCR System（Bio-Rad 公司产品）。

1.2　中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因组 DNA 序列的克隆

1.2.1　DNA 的提取：随机取健康蜂群巢房内 10 头工蜂为蜜蜂样品。取每头蜜蜂样品头胸部组织切碎，按照动物基因组 DNA 提取试剂盒（PUEX，北京）操作说明提取 DNA。

1.2.2　中华蜜蜂 *dynactin p*62 引物设计和 PCR 扩增：根据 GenBank 登录的西方蜜蜂的 *dynactin p*62 基因组 DNA 序列，利用 OLIGO 6.0 软件设计 3 对 PCR 扩增引物（表 1），由上海生工生物工程公司合成。

PCR 扩增反应体系：以提取的 DNA 作为模板，反应总体积为 25 μL，含模板 4 μL，Buffer 2.5 μL，2 μL dNTPs，0.3 μL LA-Taq DNA polymerase，上下游引物各 1 μL，14.2 μL ddH_2O。扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，52℃、58℃和 56.6℃（分别对应 3 对引物）退火 45 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存待取。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后，蒸馏水漂洗，凝胶成像系统观察分析。

1.2.3　PCR 产物回收和克隆、鉴定及序列测定：利用 DNA 琼脂糖凝胶试剂盒回收 PCR 产物，PCR 产物经切胶回收后连接到 pEasy-T3 载体上（按试剂盒说明操作），将连接产物转化至 Trans-DH5α 感受态细胞，然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后，挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体培养基（含 Amp^+）中，于 37℃震荡培养过夜，通过菌液 PCR 进行初步鉴定后，由上海英骏生物技术有限公司完成测序工作。

1.3　中华蜜蜂 *dynactin p*62 mRNA 序列的克隆

1.3.1　RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成：随机取健康蜂群巢房内工蜂为蜜蜂样品，取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻，-80℃保存，用于提取总

表 1 中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因引物

Table 1 Primers of *dynactin p*62 of *Apis cerana cerana*

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences
DNA 序列 Genomic DNA cloning	dynactin-F1	AATTCAAAATTTAATCTAATATAGGGA
	dynactin-R1	GAGGATTTTCTTGTTCAGGCC
	dynactin-F2	TGGACATCTAGAGATGCTGGCA
	dynactin-R2	GTTTGATGTTGAGTTGGATTGCA
	dynactin-F3	CCACTTCGTCCAGGTAAATCAA
	dynactin-R3	ATATGTGTGCAGCCTGAGAATG
mRNA 序列克隆 mRNA cloning	Dctn4-F1	ATTGAGAAATGTATCGCTTTATGAC
	Dctn4-R1	TGTCTATGTTGAGGGCGTAATTC
	Dctn4-F2	ACAACATCCGGACATACAAGC
	Dctn4-R2	ATGTGTGCAGCCTGAGAATG
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	P62-F1	ACCACTTCGCCCAGGTAAAT
	P62-R1	GGCACTTGTCGCACGATAGA
	Bact-Q-F	GGCTCCCGAAGAACATCC
	Bact-Q-R	TGCGAAACACCGTCACCC

RNA。每个样品用研钵在液氮中研磨后，用 Trizol 试剂盒进行 RNA 的提取。所有操作均按照试剂盒说明书进行，RNA 最后溶于 30 μL RNA-free 的 DEPC 水中，经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后，放入 -80℃ 保存。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，反应体系为 50 μL：8 μL 总 RNA，10 μL Buffer，8 μL dNTPs，1.5 μL M-MLV 反转录酶，3 μL OligodT，1 μL RNA 酶抑制剂，18.5 μL DEPC 水。反转录反应条件如下：体系混匀后，42℃反应 60 min，75℃ 5 min。反转录产物稀释一倍后保存于 -80℃待用。

1.3.2 中华蜜蜂 *dynactin p*62 引物设计和 PCR 扩增：根据前面已测出的中华蜜蜂 *dynactin p*62 的基因组 DNA 序列，利用 OLIGO 6.0 软件设计 2 对 PCR 扩增引物(表 1)，由上海生工生物工程公司合成。

PCR 扩增反应体系：以合成的 cDNA 作为模板，每个反应体系 25 μL，包含模板 4 μL，Buffer 2.5 μL，dNTPs 2 μL，上、下游引物各 1 μL，0.3 μL LA-Taq DNA polymerase。扩增程序：94℃ 预变性 3 min；94℃变性 30 s，55.4℃和 57.5℃(分别对应 2 对引物)退火 45 s，72℃延伸 1 min 30 s，30 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存待取。

1.3.3 PCR 产物回收和克隆、鉴定及序列测定：利用 DNA 琼脂糖凝胶试剂盒回收 PCR 产物，PCR 产物经切胶回收后连接到 pEasy-T3 载体上(按试剂盒说明操作)，将连接产物转化至 Trans-DH5α 感受态细胞，然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后，挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体培养基(含 Amp^+)中，于 37℃震荡培养过夜，通过菌液 PCR 进行初步鉴定后，由上海英骏生物技术有限公司完成测序工作。

1.4 序列分析

利用 DNASTAR 软件将测序后获得的 *dynactin p*62 的基因组 DNA 和 cDNA 克隆序列分别进行组装，获得完整的 *dynactin p*62 基因组 DNA 和 mRNA 序列，利用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列相似性比对分析；采用 ClustalX 软件将中华蜜蜂与西方蜜蜂 *dynactin p*62 的基因组 DNA 序列和 mRNA 序列及其编码的氨基酸序列分别进行比对。采用 Bioedit 软件对中华蜜蜂 *dynactin p*62 mRNA 序列进行六读框翻译；采用 Mega4.1 软件对已报道的物种的 *dynactin p*62 的氨基酸序列进行系统进化树的构建。

1.5 中华蜜蜂 *dynactin p*62 mRNA 相对表达量的测定

1.5.1 取样：选群势相近的健康中华蜜蜂蜂群 5 群，随机分为 5 个重复。在同一中华蜜蜂蜂群内，

蜂王、工蜂和雄蜂分别取 3 日龄（每个样品取 4 头幼虫）、6 日龄幼虫（每个样品取 1 头幼虫）和 1 日龄刚羽化的幼蜂（每个样品取 1 头幼蜂），以上样品都是取 5 份平行样。取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻，-80℃保存，用于提取总 RNA。

1.5.2　定量引物设计：在中华蜜蜂 *dynactin p*62 阅读框区设计多对特异引物用于定量 PCR 反应，根据 Livak 和 Schmittgen（2001）的方法，本研究对设计的特异性荧光定量 PCR 引物进行了筛选，获得符合要求的特异性引物，用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。同时本研究以 β-Actin 基因作为内参基因，引物为 βact-Q-F 和 βact-Q-R。荧光定量所用引物序列见表 1。

1.5.3　荧光定量 PCR 反应：qRT-PCR 反应体系为 20 μL：4 μL 反转录产物，目的基因上游和下游引物各 0.4 μL，5.2 μL H_2O，10 μL SYBR Green Ⅱ；PCR 扩增程序：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，63.7℃和 65.5℃（分别对应目的基因引物和内参基因引物）退火 45 s，72℃延伸 40 s，40 个循环；72℃延伸 10 min；最后以每 5 s 上升 0.5℃的速度从 61℃到 95℃记录熔解曲线，每个反转录 cDNA 样品。实验重复 4 次。

1.6　数据统计与分析

各基因在不同发育阶段表达量的差异通过 qRT-PCR 反应后收集目的基因（*dynactin p*62）与内参基因（*β-Actin*）的 C_T 值，用 qPCR Package（Spiess and Ritz，2010），R 软件（Hornik 2011）计算扩增效率，计算基因相对表达量（r）的数据分析方法参考 Huang 等（2012）。

2　结果与分析

2.1　中华蜜蜂 *dynactin p62* 扩增与鉴定

由于目前还没有中华蜜蜂基因组序列，因此本研究以西方蜜蜂 *dynactin p*62 的基因组序列为参考设计了 3 对引物对中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因组 DNA 序列进行 PCR 扩增，经过克隆测序，获得了长度为 2 403 bp 的中华蜜蜂基因组序列。同时以工蜂 cDNA 为模板，用 2 对基因特异性引物进行 PCR 扩增，经克隆测序获得了长度为 1 491 bp 的中华蜜蜂 *dynactin p*62 mRNA 序列。将所得中蜂 *dynactin p*62 的氨基酸序列在 NCBI Nr 数据库进行同源性检索，表明其与西方蜜蜂 *dynactin p*62 蛋白最相似。同时将中蜂 *dynactin p*62 的基因组 DNA 序列和 mRNA 序列与西方蜜蜂 *dynactin p*62 的相应序列进行比对分析，结果表明它们之间的一致性分别为 96% 和 98%（图 1，图 2），表明所获得的序列是中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因序列。

2.2　中华蜜蜂 *dynactin p62* 编码蛋白与其他物种相应蛋白比较分析

序列测定结果表明得到的中华蜜蜂 *dynactin p*62 开放阅读框（ORF）全长为 1 491 bp（图 3），编码 496 个氨基酸残基，预测分子量为 56.49 kDa，等电点为 8.31。

将中华蜜蜂 *dynactin p*62 氨基酸序列与已经报道的其他物种的 *dynactin p*62 氨基酸序列进行了同源性比较（图 4），结果表明：中华蜜蜂 *dynactin p*62 氨基酸序列（GenBank 登录号：AFP58804）与西方蜜蜂 *Apis mellifera*（GenBank 登录号：XP_001121083）、熊蜂 *Bombus impatiens*（GenBank 登录号：XP_003492272）、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（GenBank 登录号：NP_610311）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（GenBank 登录号：XP_001650614）、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（GenBank 登录号：XP_316886）、华支睾吸虫 *Clonorchis sinensis*（GenBank 登录号：GAA48949）、人（GenBank 登录号：NP_001129115）、小鼠（GenBank 登录号：NP_080578）8 个物种的 *dynactin p*62 氨基酸序列的一致性分别为 88%，91%，54%，55%，53%，46%，52% 和 57%。同时，本研究采用 Mega 4.1 软件对这 9 个物种的 *dynactin p*62 氨基酸序列构建系统进化树（图 5），结果表明，中华蜜蜂 *dynactin p*62 与西方蜜蜂 *dynactin p*62 聚成一支。

2.3　中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 相对表达量分析

利用荧光定量 PCR 分析了中华蜜蜂 *dynactin p*62 在不同发育时期(3 日龄和 6 日龄幼虫、刚羽化出房蜜蜂)三型蜂中的 mRNA 表达差异（图 6），结果显示：该基因在不同发育时期均有表达，在雌性蜜蜂（蜂王和工蜂）中，都是刚羽化时期表达量显著高于幼虫期（$P < 0.05$），并且同一发育时期相比，都是工蜂的表达量显著高于蜂王（$P < 0.05$）；而该基因在雄蜂中表达量没有明显的规律性。

3　讨论

本研究首次克隆了中华蜜蜂 *dynactin p*62，其基

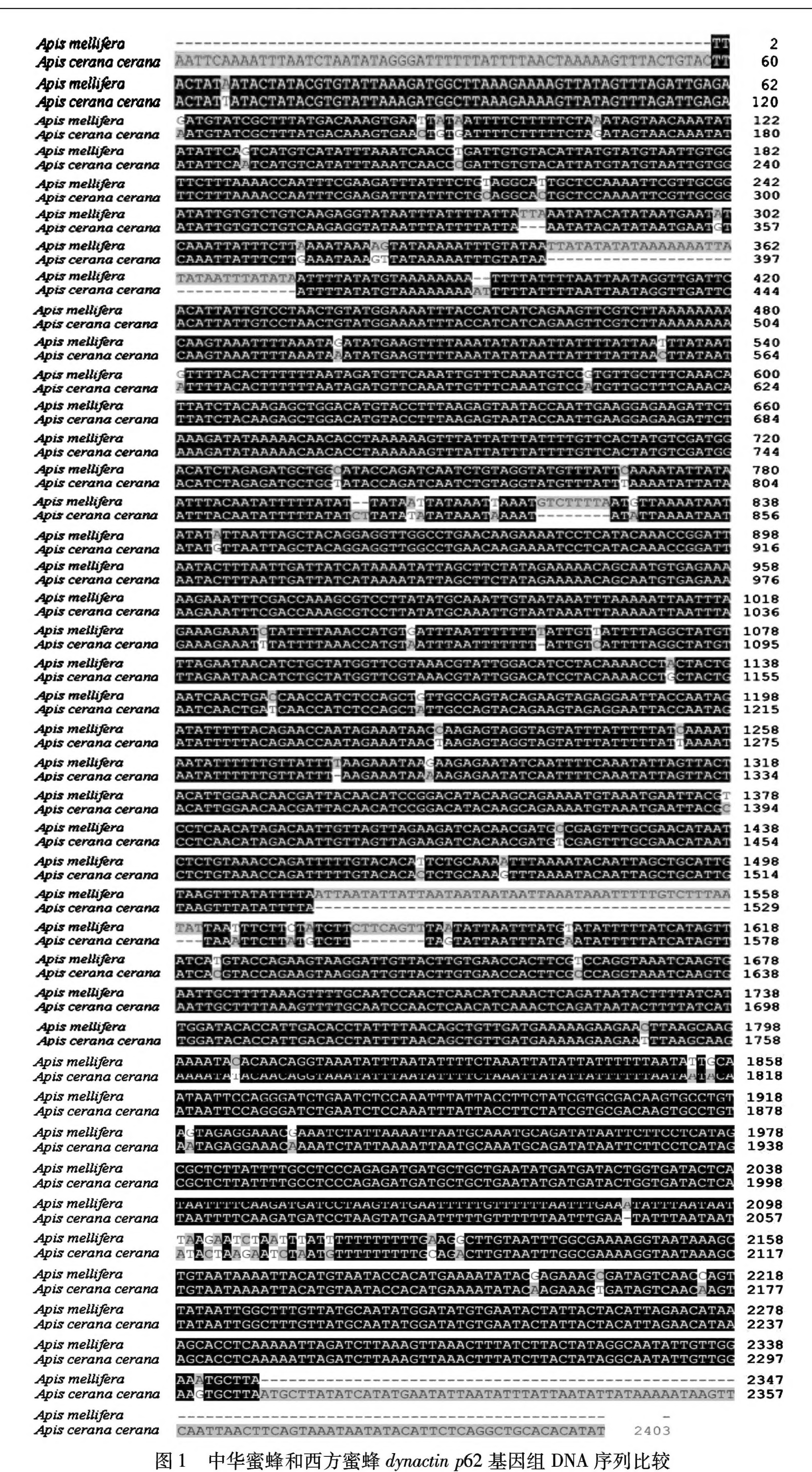


图 1 中华蜜蜂和西方蜜蜂 *dynactin p*62 基因组 DNA 序列比较

Fig. 1 Alignment of genomic sequences of *dynactin p*62 between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

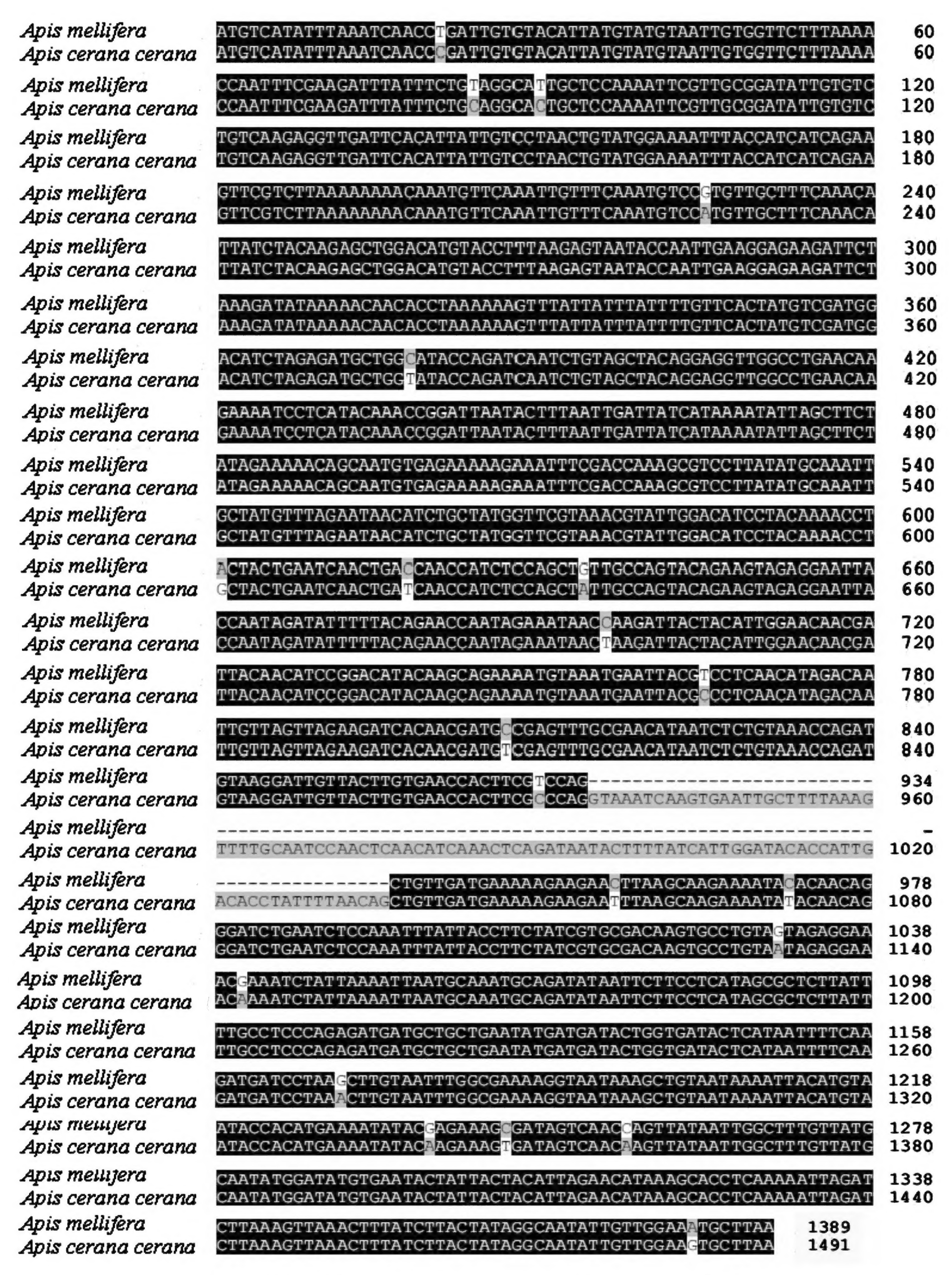


图 2　中华蜜蜂和西方蜜蜂 *dynactin p*62 mRNA 序列比较

Fig. 2　Sequence alignment of *dynactin p*62 mRNA sequences between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

因组 DNA 序列全长为 2 403 bp，cDNA 序列全长为 1 491 bp，推测蛋白质序列为 496 个氨基酸，预测分子量为 56.49 kD，等电点为 8.31。序列比对和氨基酸系统发育树分析表明，中华蜜蜂 *dynactin p*62 与西方蜜蜂 *dynactin p*62 的相似性为 88%。

随着西方蜜蜂基因组的公布，科学家首次在昆虫中发现了一个完善的功能性 DNA 甲基化系统（Wang *et al*., 2006；Zeng and Soojin, 2010）。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶的作用下使 CpG 双核苷酸 5′端的胞嘧啶转变为甲基胞嘧啶。这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列，但是它调控了基因的表达（Wu and Morris, 2001；Dahl and Guldberg, 2003）。

蜜蜂级型发育分化机理一直是个热点问题。大量研究表明，西方蜜蜂级型分化与 *dynactin p*62 甲基化水平有着密切联系（Kucharski *et al*., 2008；Shi *et al*., 2011；石元元等，2011）。中华蜜蜂蜜蜂级型分化是否与 DNA 甲基化相关，目前还不清楚，但有研究表明：中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶基因 cDNA 序列与西方蜜蜂一致性高达 99%（刘亭亭等，2012）。

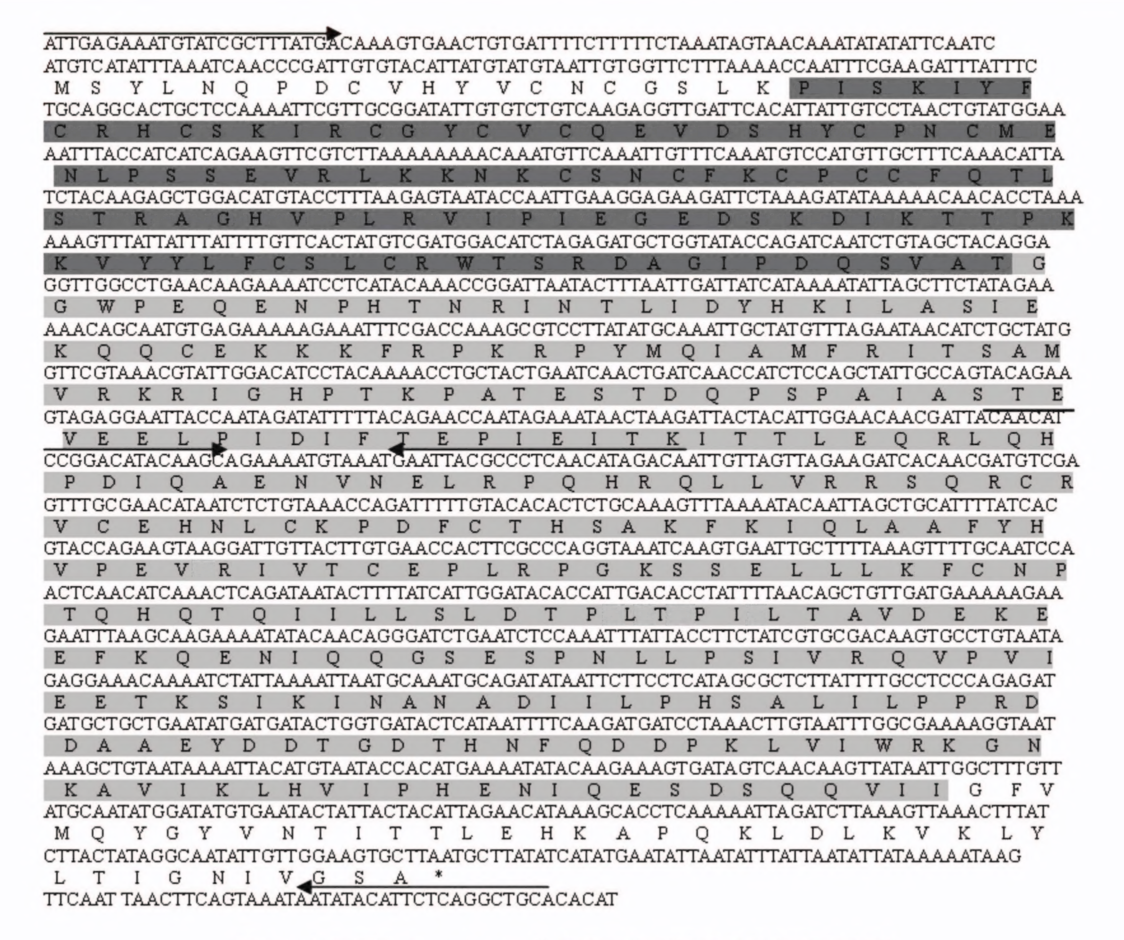


图 3 中华蜜蜂 *dynactin p*62 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *dynactin p*62 from *Apis cerana cerana*

箭头表示引物序列 The arrow indicates the primer sequence. 阴影示中华蜜蜂 dynactin p62 蛋白的 2 个结构域 The two domains of *A. c. cerana* dynactin p62 protein are in shade.

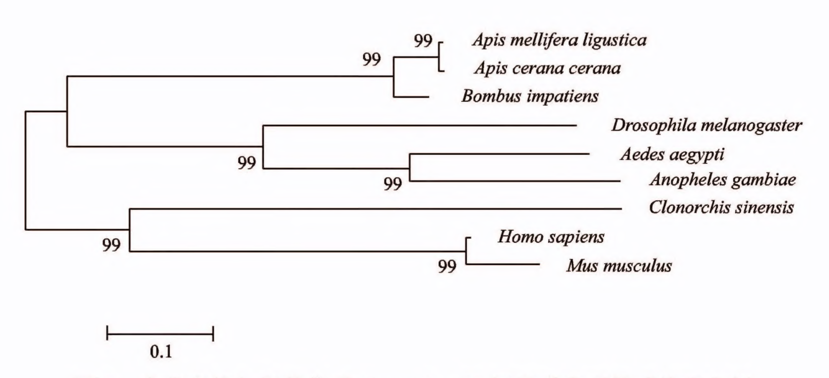


图 5 中华蜜蜂与其他物种 *dynactin p*62 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *dynactin p*62 from *Apis cerana cerana* and other species

系统发育树用邻位相连法进行了 2 400 次重复构建，数值代表物种之间的序列差异。Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining with 2 400 replications, and the number represents the sequence differences among the species.

本研究克隆了中华蜜蜂 *dynactin p*62 基因序列，为研究中华蜜蜂级型分化机理奠定了前期基础。

*dynactin p*62 在中华蜜蜂不同级型及不同发育阶段都有显著的表达差异，这表明该基因的表达受时间和空间的影响，这一特性使它能够在不同的阶段调控不同的生理过程。中华蜜蜂 *dynactin p*62 在工蜂幼虫和刚羽化的 1 日龄工蜂中表达量都显著高于同期发育的蜂王，这与已有的西方蜜蜂研究结果

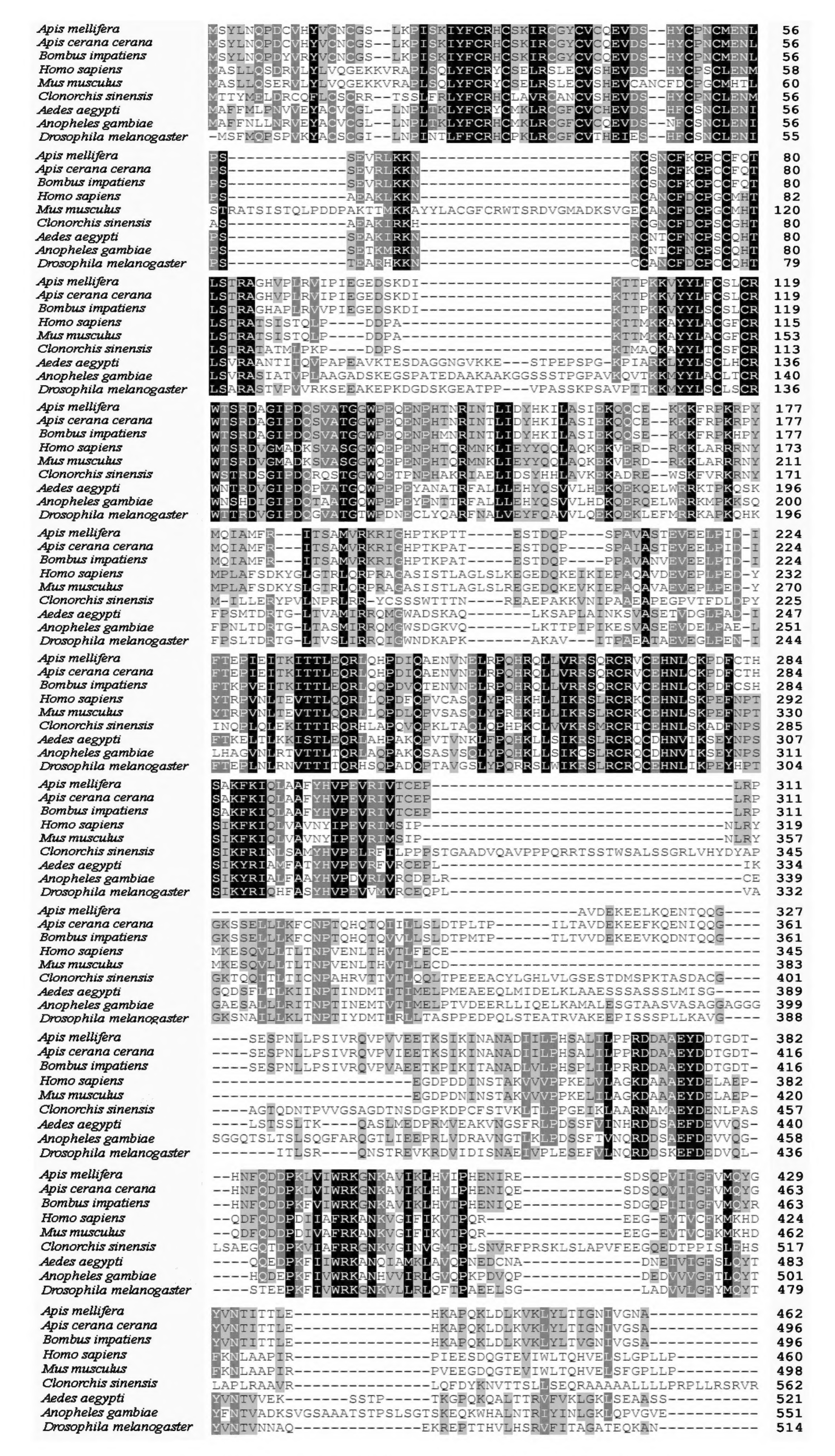


图 4　中华蜜蜂与其他物种 *dynactin p62* 氨基酸序列的比较

Fig. 4　Amino acid sequence alignment of *dynactin p62* among *Apis cerana cerana* and other species

黑色阴影表示保守性极高的残基位点；灰色阴影表示保守性较高的残基位点；缺失位点由点代替。Identical amino acids are shaded in black; amino acids with higher identity are shaded in grey; and gaps are indicated by dots.

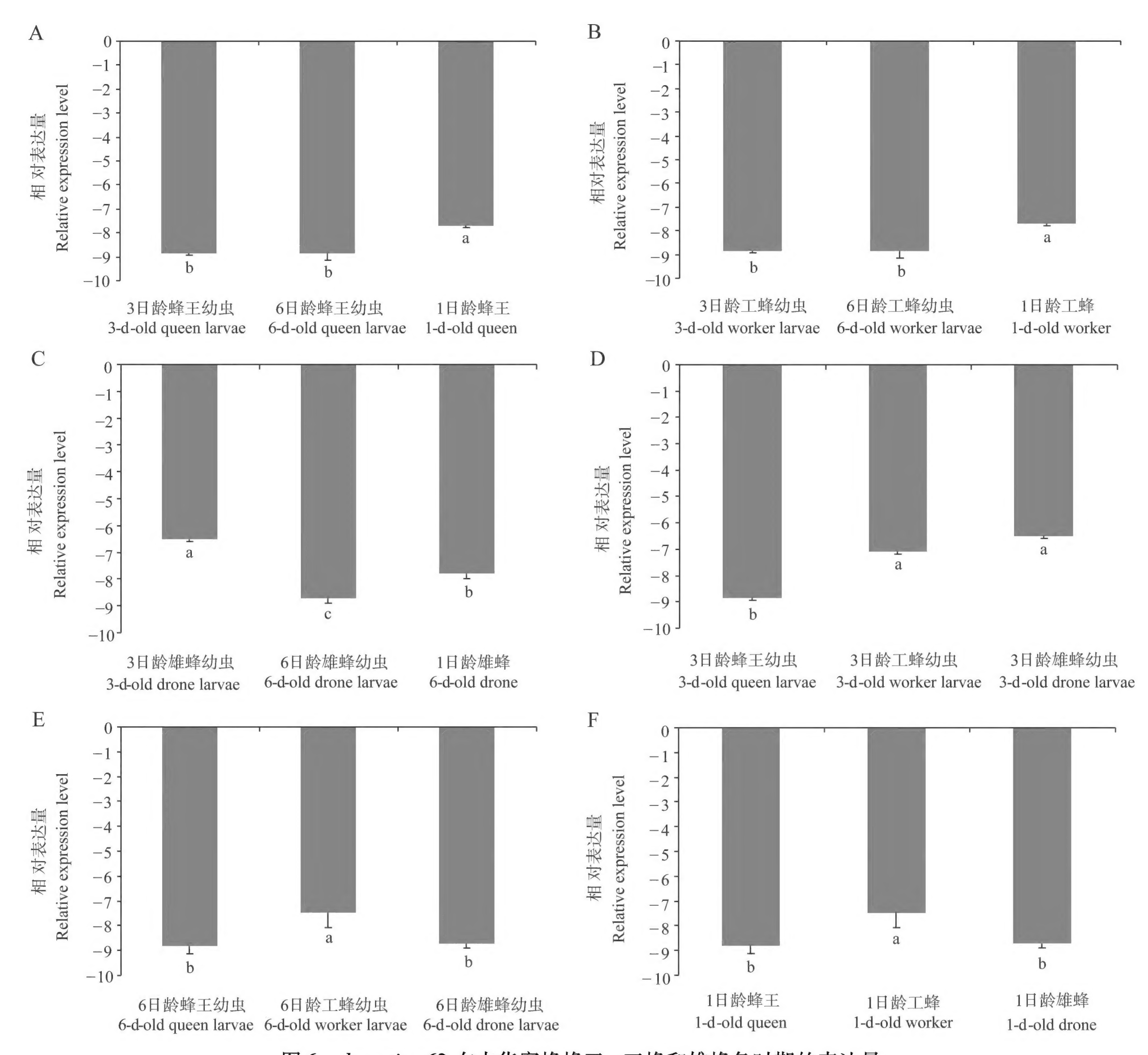


图 6 *dynactin p*62 在中华蜜蜂蜂王、工蜂和雄蜂各时期的表达量

Fig. 6 Expression level of *dynactin p*62 in different developmental stages of *Apis cerana cerana* queen, worker and drone

A：不同日龄蜂王 Different developmental stages of queen；B：不同日龄工蜂 Different developmental stages of worker；C：不同日龄雄蜂 Different developmental stages of drone；D：3 日龄蜂王、工蜂和雄蜂幼虫 3 d-old queen, worker and drone larvae；E：6 日龄蜂王、工蜂和雄蜂幼虫 6 d-old queen, worker and drone larvae；F：1 日龄蜂王、工蜂和雄蜂 1 d-old queen, worker and drone. 柱上不同的字母表示差异显著($P<0.05$，单因素方差分析)。Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (One-way ANOVA variance analysis).

一致(Kucharski *et al*., 2008)。*dynactin p*62 在雄蜂中表达量没有明显规律性，因此我们推测 *dynactin p*62 可能主要参与调控雌蜂的级型分化。但目前还不清楚中华蜜蜂 *dynactin p*62 甲基化位点调控机理以及每个甲基化位点的功能，这些都还有待于进一步研究。

致谢 实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所田柳青、王欢、秦秋红、刘亭亭等同学的支持和帮助，在此表示衷心的感谢。

参考文献 (References)

Dahl C, Guldberg P, 2003. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*, 4(4): 233－250.

Garces JA, Clark IB, Meyer DI, Vallee RB, 1999. Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. *Current Biology*, 9: 1497－1500

Hornik K, 2011. R FAQ. ISBN 3-900051-08-9. http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html.

Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RF, 2012. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(3):

297 – 302.

Karki S, Tokito MK, Holzbaur ELF, 2000. A dynactin subunit with a highly conserved cysteine-rich motif interacts directly with Arp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18): 4834 – 4839.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319: 1827 – 1830.

Liu TT, Liu JF, Wang WX, Wang H, Wang ZL, Zeng ZJ, Yan WY, 2012. Cloning and expression profiling of the DNA methyltransferase Dnmt3 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 284 – 290. ［刘亭亭，刘俊峰，王文祥，王欢，王子龙，曾志将，颜伟玉，2012. 中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶 Dnmt3 基因克隆及表达谱分析. 昆虫学报，55(3)：284 – 290］

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *methods*, 25(4): 402 – 408.

Shi YY, Huang ZY, Zeng ZJ, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, 2011. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA Methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PloS ONE*, 6 (4): e18808.

Shi YY, Zeng ZJ, Wu XB, Yan WY, Wang ZL, 2011. Influence of injecting Dnmt3 siRNA on the development of females of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 54 (3): 272 – 278. ［石元元，曾志将，吴小波，颜伟玉，王子龙，2011. 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌蜂发育的影响. 昆虫学报，54(3)：272 – 278］

Spiess A, Ritz C, 2010. qPCR: modelling and analysis of real-time PCR data. R Package Version 1.3 – 4.

The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931 – 949

Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314: 645.

Wu CT, Morris JR, 2001. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293: 1103 – 1105.

Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401 – 406. ［杨冠煌，2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报，48(3)：401 – 406］

Zeng J, Soojin VY, 2010. DNA methylation and genome evolution in honeybee: gene length, expression, functional enrichment covary with the evolutionary signature of DNA methylation. *Genome Biology Evolution*, 2: 770.

（责任编辑：赵利辉）